

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Leonina Moslavac

7122/BT

**SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE POLIFENOLA U ETANOLNIM
EKSTRAKTIMA RUŽMARINA (*Rosmarinus officinalis*)**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitička kemija

Mentor: Doc. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija**

**Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u etanolnim ekstraktima ružmarina
(*Rosmarinus officinalis*)**

Leonina Moslavac, 0058207260

Sažetak: Mali broj znanstvenih radova je pokazao da polifenoli kao aktivne komponente biljnog materijala, ključne za održavanje ravnoteže ljudskog organizma, osim antioksidacijskih posjeduju i antikorozijske osobine. Zbog izražene sposobnosti adsorpcije na metale i metalne legure, zauzimaju značajno mjesto pri ispitivanju antikorozijskog djelovanja. U ovom radu pripremljeni su etanolni (30 i 70 %, v/v) ekstrakti osušenih i usitnjenih listova ružmarina, primjenom ultrazvuka visokog intenziteta i refluksiranja. Procesni parametri primijenjeni kod ekstrakcije ultrazvukom bili su vrijeme od 3, 6 i 9 min i amplituda od 60, 80 i 100 % te vrijeme ekstrakcije od 1,5 i 3 h kod metode refluksiranja. Maseni udio ukupnih fenola i flavonoida u pripremljenim ekstraktima određen je UV/Vis spektrofotometrijskim testom. Ekstrakti s najvećim udjelima polifenola, dobiveni upotrebom 70 %-tnog etanola, pri vremenu ekstrakcije od 9 min i 100 %-tnoj amplitudi (optimalni parametri) koristit će se u njihovim daljnjim ispitivanjima kao antikorozijskih supstancija.

Ključne riječi: antikorozijska i antioksidacijska svojstva, polifenoli, ružmarin, ultrazvuk, UV/Vis spektrofotometrija

Rad sadrži: 30 stranica, 6 slika, 9 tablica, 18 literarnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Doc. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino

Pomoć pri izradi: Darjan Pipić, tehnički suradnik

Datum obrane: 8. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

**Spectrophotometric determination of polyphenols from ethanolic extracts of
rosemary (*Rosmarinus officinalis*)**

Leonina Moslavac, 0058207260

Abstract: A few scientific papers have shown that polyphenols as active components of plant materials relevant for maintaining balance in human organism, besides antioxidants, also possess anticorrosive properties. Due to its capability of adsorption on metals and metal alloys, they occupied important place in investigations of anticorrosion activity.

In this paper, ethanolic (30 and 70 %, v/v) extracts of dried and milled rosemary leaves are prepared by application of high intensity ultrasound and refluxing methods. Process parameters applied for ultrasound extraction were time of 3, 6, 9 min and amplitude of 60, 80 and 100 %, and extraction time of 1,5 and 3 h for reflux method. Mass fractions of total phenols and flavonoides are determined by UV/Vis spectrophotometric test. Extracts with the highest mass fractions of polyphenols, obtained by 70 % ethanol at extraction time of 9 min and 100 % amplitude (optimal conditions) will be used for their further examination as anticorrosive substance.

Keywords: anticorrosion and antioxidant activity, polyphenols, rosemary, ultrasound, UV/Vis spectrophotometry

Thesis contains: 30 pages, 6 figures, 9 tables, 18 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Assistant Professor, PhD, Antonela Ninčević Grassino

Technical support and assistance: Darjan Pipić, Technical Associate

Defence date: 8th of September, 2017.

Sadržaj:

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio.....	2
2.1. Ružmarin.....	2
2.2. Polifenoli.....	2
2.2.1. Flavonoidi i fenolne kiseline.....	3
2.2.2. Polifenoli prisutni u ružmarinu.....	4
2.2.3. Antioksidacijska aktivnost polifenola.....	5
2.2.4. Zdravstveni učinak polifenola.....	6
2.3. Utjecaj procesnih parametara na ekstrakciju polifenola.....	6
2.4. Metode ekstrakcije polifenola.....	8
2.4.1. Soxhlet ekstrakcija.....	8
2.4.2. Maceracija.....	9
2.4.3. Ekstrakcija refluksiranjem.....	9
2.4.4. Destilacija.....	9
2.4.5. Ekstrakcija ultrazvukom visokog intenziteta.....	10
2.4.6. Ekstrakcija primjenom pulsirajućeg električnog polja.....	10
2.4.7. Enzimska razgradnja.....	10
2.5. UV/Vis spektrofotometrija.....	11
3. Eksperimentalni dio.....	12
3.1. Materijal.....	12
3.2. Kemikalije.....	12
3.3. Aparatura i pribor.....	12
3.4. Metode rada.....	13
3.4.1. Ekstrakcija polifenola iz ružmarina ultrazvukom visokog intenziteta.....	13
3.4.2. Ekstrakcija polifenola iz ružmarina refluksiranjem.....	14
3.4.3. Određivanje boje u etanolnim ekstraktima ružmarina.....	14
3.4.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida.....	14
3.4.4.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola.....	14
3.4.4.2. Postupak određivanja ukupnih fenola.....	15
3.4.4.3. Priprema otopina za određivanje flavonoida.....	16
3.4.4.4. Postupak određivanja flavonoida.....	16
4. Rezultati i rasprava.....	18

4.1. Određivanje boje u etanolnim ekstraktima ružmarina.....	18
4.2. Određivanje ukupnih fenola u etanolnim ekstraktima ružmarina.....	20
4.3. Određivanje flavonoida u etanolnim ekstraktima ružmarina.....	24
5. Zaključak.....	28
6. Popis literature.....	29

1. Uvod

U današnje vrijeme sve veći naglasak se stavlja na mogućnostima iskorištavanja biljnog materijala za potrebe prehrambene, farmaceutske i kozmetičke industrije. Postoji cijeli niz biljnih tvari koje se odlikuju visokom biološkom aktivnošću, a među njima ističu se i polifenoli. Oni su prisutni u začinskim biljkama te voću i povrću i cijenjeni su zbog svoje mogućnosti primjene u liječenju različitih oboljenja, najčešće kardiovaskularnog tipa, zaštite kože od djelovanja UV zraka, usporavanja procesa starenja i dr. Ove navedene karakteristike su povezane s njihovim antioksidativnim djelovanjem, tj. sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, doniranja vodikovih atoma ili elektrona te keliranja metalnih kationa. Pored antioksidacijskih osobina, ove biljne tvari karakterizira i antikorozijsko djelovanje koje se iskazuje u sposobnosti adsorpcije na metale i metalne legure, te stvaranja zaštitnih filmova. Primjena prirodnih korozijskih inhibitora, umjesto kemijski sintetiziranih, toksičnih inhibitora postaje sve veći trend u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Sve više se istražuje potencijal biljnog materijala zbog svoje prirode, lakše dostupnosti i ekonomske isplativosti (Al - Otaibi i *sur.*, 2012).

Iz tog razloga, u ovom radu je provedena ekstrakcija polifenola iz osušenih i usitnjenih listova ružmarina, a dobiveni ekstrakti s najvećim udjelima ukupnih fenola i flavonoida će se primjenjivati u daljnjim ispitivanjima inhibicije korozije metala/metalne ambalaže. Zbog svojih antikorozijskih i antioksidacijskih svojstava usko povezanih sa strukturom polifenola, u ovom radu je opisana njihova podjela, kao i pripadajuće strukture. Također, opisane su i metode ekstrakcije biljnog materijala od kojih je najviše istaknuta ekstrakcije ultrazvukom.

Dakle, provedeno istraživanje sastojalo se od sljedećih faza:

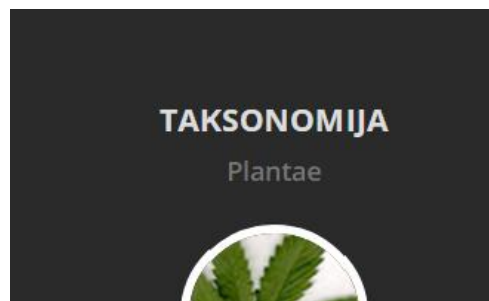
- Priprave 30 i 70 %-tnih etanolnih ekstrakata ružmarina primjenom ultrazvuka visokog intenziteta (vrijeme od 3, 6, 9 min i amplitudama od 60, 80, 100 %) i refluksiranja (vrijeme od 1,5 i 3 h).
- Određivanja masenih udjela ukupnih fenola i flavonoida u 30 i 70 %-tnim etanolnim ekstraktima UV/Vis spektrofotometrijskim testom.
- Određivanja optimalnih parametara ekstrakcije polifenola iz ružmarina koji će se primijeniti pri daljnjim pripravama ekstrakata namijenjenih za antikorozijska testiranja na metalima/metalnoj ambalaži.

2. Teorijski dio

2.1. Ružmarin

Rosmarinus officinalis, poznatiji pod nazivom ružmarin, je višegodišnja zimzelena grmolika biljka koja raste u mediteranskom području. Pripada porodici usnača (Lamiaceae) koja se odlikuje po velikom broju biljaka privlačnih cvjetova te karakterističnih svojstava koja svoju primjenu mogu naći u različitim industrijama (Mulinacci i sur., 2011). Karakterističnog je izgleda; listovi su nasuprotni, sjedeći, kožasti te vrlo uski (izgledom podsjećaju na male iglice), s ljubičasto - plavim cvjetovima, koji se razvijaju na malim peteljka u pazušcima gornjih listova.

Ružmarin je biljka koja se ističe aromatičnim mirisom, izražajnim okusom i brojnim ljekovitim svojstvima. Dijelovi biljke koji se najviše koriste su svježi ili osušeni listovi, a primjenu nalaze kao začini u kulinarstvu, za poboljšanje organoleptičkih i funkcionalnih svojstava hrane. Od listova se dobivaju i eterična ulja tri kemotipa, cineol, verbenon i kamfor, a najčešće se primjenjuju za poboljšanje cirkulacije, olakšavanje kašlja te u kozmetici kod izrade pripravaka za kožu i dr. (Ali i sur., 2015).

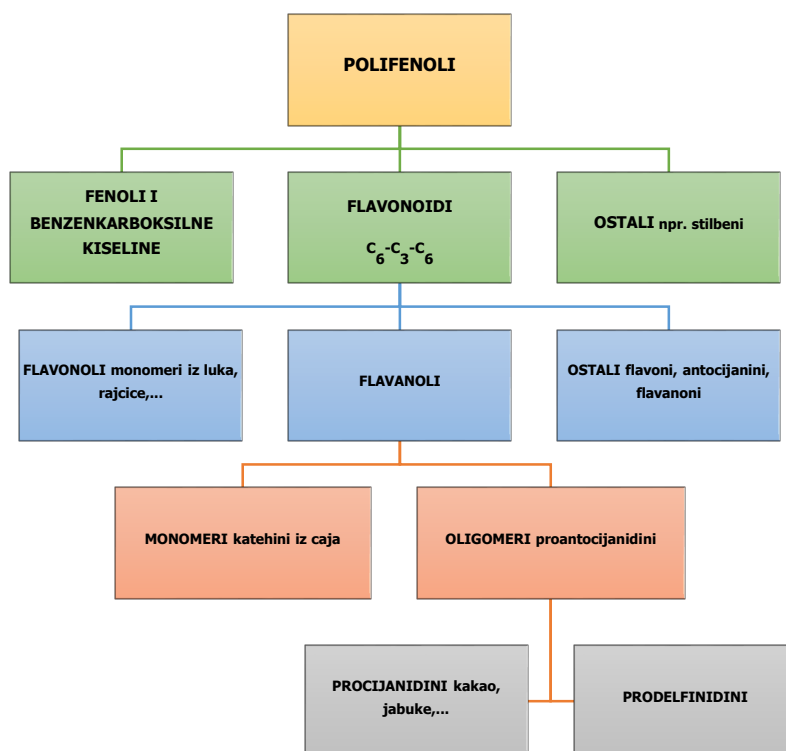


CARSTVO:	Plantae
RED:	Lamiales
PORODICA:	Lamiaceae
ROD:	Rosmarinus
VRSTA:	Rosmarinus officinalis

2.2. Polifenoli

Prirodne komponente biljnog materijala s potencijalom iskoristivosti u medicinske, prehrambene i druge svrhe su predmet sve većeg broja istraživanja. Njima pripadaju i polifenoli, koji se zbog svojeg antimikrobnog i antioksidacijskog potencijala mogu iskoristiti za smanjenje rizika oboljenja od različitih kardiovaskularnih, intestinalnih i drugih oboljenja, pojavu mutageneze ljudskih stanica i redukciju oštećenja slobodnim radikalima (Dinnies Santos i sur., 2012). Skupinu ovih sekundarnih biljnih metabolita tvore heterogeni spojevi (Slika 1), različitih struktura i kemijskih svojstava (Berend i Grabarić). Zajedničko obilježje svih polifenola je postojanje aromatskog prstena s jednom ili više hidroksilnih grupa koje utječu na molekularnu masu polimera (Khoddami i sur., 2013). Polifenoli se u biljkama

javljaju u konjugiranom obliku s monosaharidima i polisaharidima te u obliku estera. Najčešće su prisutni u voću (grožđe, citrusi, jabuke i trešnje), povrću (luk, špinat, brokula, artičoka i rajčica), te u različitim pićima kao što su crni i zeleni čaj, kava, crveno vino, kakao i dr. Njihov udio u biljnim vrstama varira ovisno o biljci, uvjetima kultivacije, zrelosti biljke i načinu njena skladištenje (Brglez Mojzer i *sur.*, 2016).



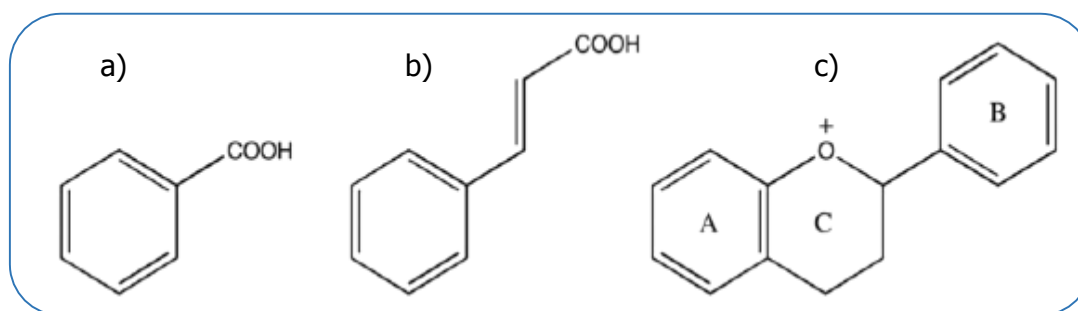
Slika 1. Osnovna podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008).

2.2.1. Flavonoidi i fenolne kiseline

Flavonoidi tvore najveću skupinu spojeva unutar grupe polifenola. Derivati su aromatskih aminokiselina tirozina i fenilalanina i karakteristični su zbog svoje konfiguracije od 15 ugljikovih atoma organiziranih u obliku C₆-C₃-C₆ lanca, tj. difenilpropanskog kostura, prikazanog na Slici 2. Ovaj kostur je građen od dva benzenska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom (C) (Balasundram i *sur.*, 2005). Zbog vezanja supstituenta na prstene B i C, različitog stupnja hidroksilacije, alikacije, glikolizacije te prenilacije dolazi do promjene u osnovnoj strukturi flavonoida, što utječe na stvaranje flavonoidnih podgrupa: flavona, izoflavona, flavanona, flavan-3-ola, antocijana, procijanidina i flavan-3,4-diola.

Flavonoidi su u biljnom materijalu vezani u obliku β -glikozida na glukozu, galaktozu, ksilozu i arabinofuranozu (Brglez Mojzer i *sur.*, 2016). Njihovo djelovanje očituje se u antialergijskom, antitrombotskom, antibakterijskom i protuupalnom učinku.

Fenolne kiseline, kao druga najvažnija skupina polifenola, dijele se na dvije podgrupe koju tvore hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, osnovne strukture prikazane na Slici 2. Hidroksibenzojeve kiseline obuhvaćaju galnu, sinerginsku, protokatehinsku, vanilnu te p-hidroksibenzojevu kiselinu, a hidroksicimetne kafeinsku, ferulnu, sinapinsku i druge (Balasundram i *sur.*, 2005). Ovi spojevi se u biljnom materijalu nalaze u obliku estera koji mogu biti u topljivom obliku, prisutni u vakuolama te u netopljivom obliku inkorporirani unutar staničnih membrana. Pronalazimo ih u voću (bobičasto voće i jabuke), povrću (kelj, brokula i špinat), maslinovom ulju, žitaricama te različitim pićima kao što su kava, čaj, vino i pivo. Primjenjuju se kao hepatoprotektivni lijekovi, protuupalni agensi i antioksidansi (Brglez Mojzer i *sur.*, 2016).

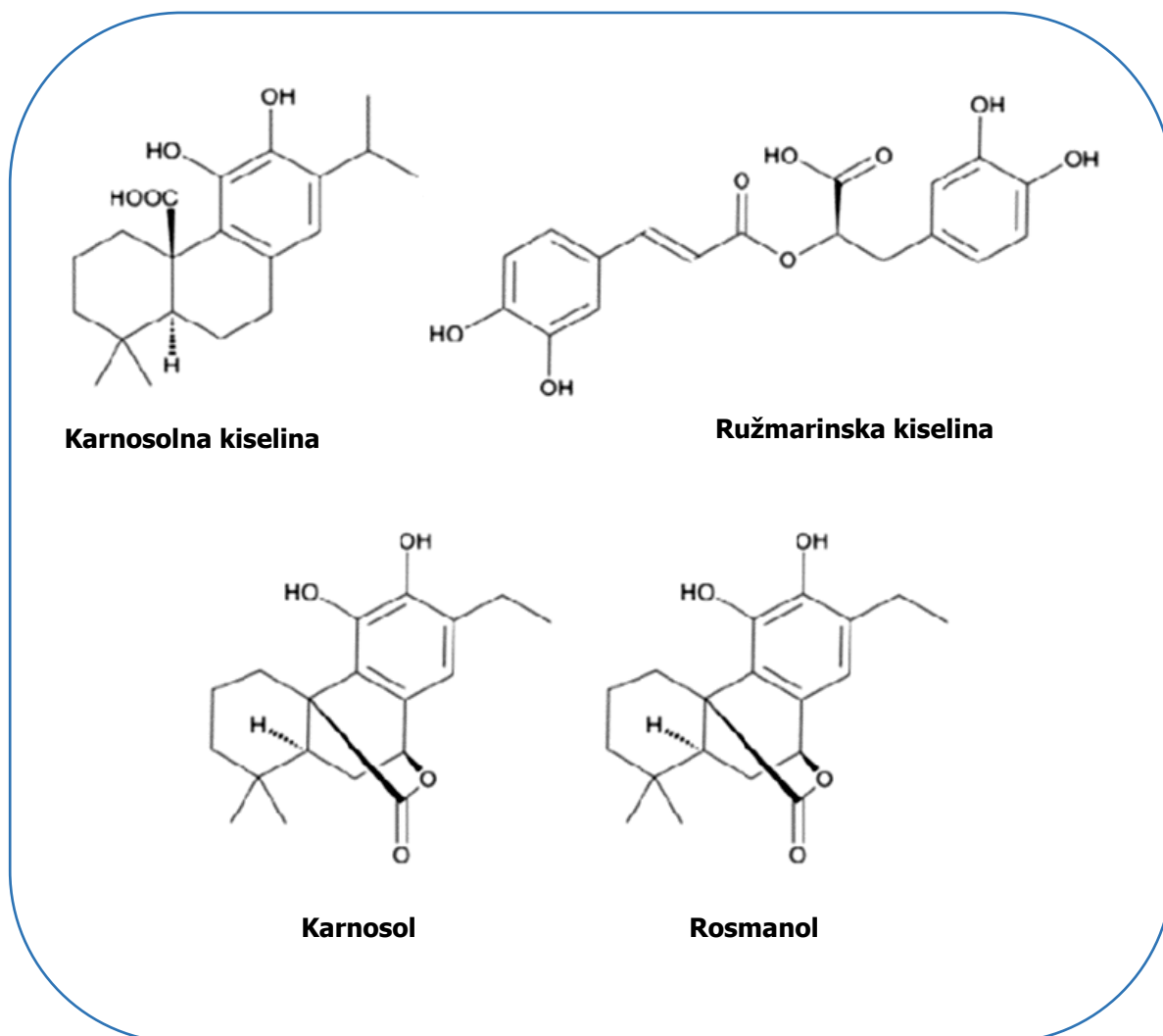


Slika 2. Osnovne strukture a) hidroksibenzojevih i b) hidroksicimetnih fenolnih kiselina i c) flavonoida (Khoddami i *sur.*, 2013).

2.2.2. Polifenoli prisutni u ružmarinu

Dvije grupe bioaktivnih komponenata u ružmarinu su odgovorne za njegova ljekovita svojstva, frakcija koju tvore komponente podložne brzom isparavanju (timol, cineol i dr.) te polifenolne komponente. Polifenoli najvećim dijelom odgovorni za antioksidacijska svojstva ružmarina su karnosol, rosmanol, karnosolna i ružmarinska kiselina (Slika 3), te u manjoj mjeri epirosmanol i metil-epirosmanol (Mulinacci i *sur.*, 2011). Od navedenih spojeva dokazano je da najveću antioksidacijsku aktivnost posjeduje ružmarinska kiselina (Dinnies Santos i *sur.*, 2012). Naime, njezin antioksidacijski potencijal se očituje u sprječavanju rasta i napredovanja tumora, tj. zaustavljanju malignih bolesti zbog svog antiangiogenetskog učinka.

Također, ružmarinska kiselina pokazuje i antifibrogenski efekt na stanice jetre, koji je još u procesu intenzivnog istraživanja (Mulinacci i *sur.*, 2011).



Slika 3. Osnovna struktura polifenola prisutnih u ružmarinu (Mulinacci i *sur.*, 2011).

2.2.3. Antioksidacijska aktivnost polifenola

Oksidacija je proces prijenosa atoma vodika ili elektrona s molekule na molekulu. U organizmu ovakav proces može utjecati na razvoj degenerativnih bolesti vezanih uz starenje kao što su različite srčane bolesti, kognitivna disfunkcija i dr. Također, može doći do pojave oksidativnog stresa koji se karakterizira kao poremećaj u ravnoteži između stvaranja reaktivnih kisikovih čestica (slobodnih radikala) i antioksidanta. Naime, ova pojava može uzorkovati oštećenje i utjecati na funkciju ugljikohidrata, lipida, nukleinskih kiselina te

inducirati pojavu različitih oboljenja. Antioksidanti su zbog navedenog ključni za održavanje homeostaze organizma, ali se njihova aktivnost može primijeniti i u drugim područjima istraživanja.

Antioksidacijska aktivnost polifenola očituje se u sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, doniranja vodikovih atoma ili elektrona te keliranja metalnih kationa (Amarowicz i *sur.*, 2004; Balasundram i *sur.*, 2005). Struktura polifenolnih spojeva može utjecati na antioksidacijsku aktivnost pa se tako kod fenolnih kiselina stupanj antioksidacijske aktivnosti očituje po broju i položaju hidroksilnih skupina u odnosu na karboksilne. Kao primjer navedenog može poslužiti monohidroksibenzojeva kiselina čija se antioksidacijska aktivnost očituje kada je hidroksilna skupina u *meta*, a ne u *ortho* ili *para* položaju, u odnosu na karboksilnu skupinu. Također, veći stupanj hidroksilacije fenolnih kiselina povećava njihovu antioksidacijsku aktivnost, dok supstitucija hidroksilne s metoksilnom skupinom na 3. i 5. položaju utječe na smanjenje iste. Ako se uspoređuju obje podgrupe fenolnih kiselina, hidroksicimetna pokazuje veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na hidroksibenzojevu, što je posljedica prisutnosti $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ grupe unutar hidroksicimetne kiseline. Ona pokazuje veću sposobnost doniranja vodikovih atoma u odnosu na $-\text{COOH}$ skupinu hidroksibenzojeve kiseline (Balasundram i *sur.*, 2005).

Mehanizam antioksidacijske aktivnosti flavonoida je složeniji u odnosu na fenolne kiseline. Pri tome strukturne promjene na B i C prstenu određuju konačnu antioksidacijsku aktivnost, a ona koja uključuje (Balasundram i *sur.*, 2005):

- Stupanj hidroksilacije i pozicija $-\text{OH}$ skupina na B prstenu
- Prisutnost $-\text{OH}$ skupine na 30', 40' i 50' položaju prstena B
- Dvostruka veza između C-2 i C-3 atoma, te veza $-\text{OH}$ skupine na 3' položaju u prstenu C
- Supstitucija hidroksilnih skupina sa metoksilnim prstena B

2.2.4. Zdravstveni učinak polifenola

Budući da su polifenoli jedna od sastavnica biljnog materijala, svojim pozitivnim učincima djeluju i na samu biljku. Efekt njihova djelovanja očituje se u zaštiti od reaktivnih kisikovih i dušikovih čestica, UV svjetla, patogena, parazita i biljnih nametnika. Također, doprinose organoleptičkim svojstvima biljaka, ali i namirnicama, kao i drugim proizvodima u koje se dodaju (Brglez Mojzer i *sur.*, 2016). Njihovo djelovanje, posebno antioksidacijska aktivnost (Atanassova i *sur.*, 2011), ima veliki utjecaj na ljudski organizam. Tako je dokazano da

polifenoli utječu na razvoj i supresiju različitih bolesti te proces iscjeljenja. Pokazuju hormonalni i inhibitorni učinak na resorpciju koštanog tkiva zbog čega su predmet istraživanja u liječenju karcinoma te drugih malignih oboljenja. Njihova dostupnost u ljudskom tkivu ovisi o građi stanice, lokaciji glikozida te načinu vezanja polifenola u tkivu (Balasundram i *sur.*, 2005).

2.3. Utjecaj procesnih parametara na efikasnost ekstrakcije polifenola

Ekstrakcija aktivnih komponenata iz biljnog materijala obuhvaća primjenu selektivnih otapala, zračenja, visokog tlaka i temperature s ciljem odvajanja željenih komponenata od ostatka matriksa. Primjena određene metode ekstrakcije ovisi o vrsti, veličini čestica te prisutnosti interferirajućih komponenata u biljnom materijalu (Brglez Mojzer i *sur.*, 2016). Odabir metode, kao i primjena tlaka, temperature, vremena ekstrakcije, te odgovarajućeg otapala može imati značajan utjecaj na prinos i kvalitetu izoliranih polifenola (Khoddami i *sur.*, 2013; Brglez Mojzer i *sur.*, 2016). Općenito, svaki od navedenih parametara ima svojevrsan utjecaj na stabilnost polifenola, ali i ostalih komponenata u reakcijskoj smjesi.

Budući da se polifenoli međusobno razlikuju u strukturi i interakcijama sa sastavnim komponentama biljnog materijala, otapalo za ekstrakciju mora sadržavati odgovarajuće karakteristike kako bi izolacija bila što uspješnija. Stoga, pri odabiru odgovarajućeg otapala treba uzeti u obzir vrstu biljnog tkiva i polifenolne spojeve koji prevladavaju u takvim tkivima te interakcije otapala sa sastojcima biljnog materijala (Drużyńska i *sur.*, 2007). Polarnost polifenola je jedan od najznačajnijih faktora koji utječu na odabir otapala za ekstrakciju. Otapala kao što su etanol, metanol, aceton, acetonitril, voda i mnogi drugi, zbog svojih kemijskih svojstva, na različit način utječu na konačan prinos polifenola. Organska otapala poput metanola bolja su u ekstrakciji polifenola manje molekulske mase, dok vodene otopine acetona pokazuju bolju ekstrakciju polifenola veće molekulske mase (Brglez Mojzer i *sur.*, 2016). Mulinacci i *sur.* (2011) su pokazali da vodene otopine metanola dovode do smanjenja prinosa ružmarinske i kafeinske kiseline tijekom ekstrakcije ružmarina, u odnosu na vodene otopine etanola.

Osim prikladnog otapala, i temperatura ekstrakcije (Herrero i *sur.*, 2010) je jedan od dodatnih čimbenika koji se mora uzeti u obzir tijekom postupka izolacije aktivnih komponenata iz biljnog materijala. Općenito, povišena temperatura olakšava razbijanje stanične stijenke, pucanje veza između polifenola i drugih komponenata biljnog materijala, osiguravajući bolju difuziju i prijenos mase u odgovarajućem otapalu (Galvan d'Alessandro i

sur., 2012). Međutim, povišena temperatura može dovesti i do degradacije ciljanih komponenata (analiti), što drastično utječe na konačan rezultat ekstrakcije (Sun i *sur.*, 2011).

I vrijeme ekstrakcije može utjecati na prinos polifenola, pri čemu njihov udio uglavnom kontinuirano raste s povećanjem vremena. Međutim povećanje vremena ekstrakcije nije ekonomično jer je cilj većine procesa prirediti više ekstrakata u što kraćem periodu. Također, produljenjem vremena ekstrakcije smanjuje se brzina difuzije aktivnih komponenata iz biljnog materijala u otapalo pa su razlike u masenim udjelima izoliranih komponenata između vremenski bliskih intervala neznčajne (Galvan d'Alessandro i *sur.*, 2012).

2.4. Metode ekstrakcije polifenola

Ekstrakcija komponenata iz biljnog materijala uključuje proces pripreme uzorka, tj. sušenje biljke na zraku i mljevenje do određene granulacije čestica, a potom slijedi ekstrakcija usitnjenog materijala primjenom odgovarajuće konvencionalne ili nekonvencionalne metode. Konvencionalne tehnike ekstrakcije se temelje na primjeni selektivnih otapala, povišene temperature uz ili bez miješanja reakcijske smjese. Dije se na Soxhlet ekstrakciju, maceraciju, refluksiranje i destilaciju.

Kako bi se osigurao što uspješniji proces ekstrakcije polifenola te prevladali nedostaci konvencionalnih metoda, kao što su dugotrajno vrijeme ekstrakcije, primjena otapala visoke čistoće i velikih volumena, niske selektivnosti te razgradnja termolabilnih spojeva, došlo je do razvoja tzv. nekonvencionalnih metoda ekstrakcije (Azmir i *sur.*, 2013). One obuhvaćaju upotrebu ultrazvuka, pulsno električnog polja i enzima te mnogih drugih tehnika koje su još u razvoju. Zbog većeg prinosa bioaktivnih komponenata, skraćenog vremena i poboljšane kvalitete ekstrakta, ove metode pronalaze sve veću primjenu.

2.4.1. Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet ekstrakcija je vrsta ekstrakcije čija je primjena u početku bila ograničena na izolaciju lipida, a naposljetku se proširila i na izolaciju ostalih bioaktivnih komponenata. Princip rada bazira se na uparavanju, kondenzaciji visoko selektivnog otapala koje prolazi kroz celulozni tuljac u kojemu se nalazi usitnjeni i homogenizirani čvrsti uzorak. Otapalo zadržava analit te se vraća u tikvicu zajedno sa ekstraktom. Proces se provodi kontinuirano sve dok se ne

ekstrahira određeni analit. Osnovni nedostaci Soxhlet ekstrakcije su dugo trajanje procesa (10 do 24 h), zagađenje okoliša zbog velike potrošnje organskih otapala (300 mL/uzorak) te potreba za stabilnošću spojeva koji se ekstrahiraju na temperaturi vrenja otapala (Azmir i *sur.*, 2013).

2.4.2. Maceracija

Maceracija je proces ekstrakcije koji se sastoji od nekoliko koraka. Prvi dio obuhvaća mljevenje biljnog materijala do određene granulacije čestica kako bi se povećala kontaktna površina između samih čestica i otapala te na taj način poboljšala i učinkovitost ekstrakcije. Potom se samljeveni materijal i odgovarajuće otapalo stavljaju u posudu u kojoj se zadržavaju određeni period, a nakon ekstrakcije zasićena otopina analita odvaja se od ostatka maceriranog materijala (taloga) filtriranjem. Maceracija se provodi na sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje kako bi se pospješio proces difuzije bioaktivnih komponenata u otapalo i povećao prinos analita.

2.4.3. Ekstrakcija refluksiranjem

Ova metoda se provodi na način da se tikvica koja sadrži biljni materijal u odgovarajućem otapalu zagrijava do temperature vrenja otapala. Pare otapala koje sadrže ekstrahirane komponente kondenziraju se prolaskom kroz povratno hladilo. Na kraju procesa refluksiranja biljne komponente moraju se odvojiti od otapala postupcima filtracije ili dekantiranja. Unatoč efikasnosti, ova metoda se slabije primjenjuje zbog upotrebe velikih volumena otapala, dugotrajnog vremena ekstrakcije te dodatnog pročišćavanja otopine analita zbog mogućnosti ekstrahiranja nepoželjnih komponenata (interferenti).

2.4.4. Destilacija

Izolacija bioaktivnih komponenata vrši se zagrijavanjem usitnjenog biljnog materijala postupcima: (a) vodene destilacije, (b) destilacije vodenom parom i (c) direktnom destilacijom parom (Azmir i *sur.*, 2013). Lako hlapljive komponente prenose se parom u kondenzator gdje se postupkom dekantiranja odjeljuju. Osnovni nedostatak ove metode je razgradnja termolabilnih spojeva djelovanjem povišene temperature pa se ova metoda u manjoj mjeri koristi za izolaciju polifenola (Herrero i *sur.*, 2010).

2.4.5. Ekstrakcija ultrazvukom visokog intenziteta

Ultrazvuk je zvučni val frekvencije 20 kHz do 100 MHz (Azmir i *sur.*, 2013). Metoda se bazira na sonifikaciji, tj. propuštanju ultrazvučnih valova kroz otopinu koja se sastoji od usitnjenog biljnog materijala i odgovarajućeg otapala. Pritom dolazi do procesa kavitacije, tj. formiranja mjehurića unutar reakcijske smjese čija se veličina povećava djelovanjem ultrazvučnih valova. Uz proces kavitacije dolazi i do zagrijavanja otopine te pojave vibracija. Njihovim zajedničkim djelovanjem narušava se struktura biljnih stanica te oslobađa unutarstanični sadržaj u otopinu. Navedena metoda je vrlo efikasna kod izolacije polifenola iz biljnog materijala zbog redukcije vremena ekstrakcije, pri čemu se mora uzeti u obzir temperatura medija kao i odabir otapala te distribucija ultrazvučnih valova u reakcijskoj smjesi (Khoddami i *sur.*, 2013).

2.4.6. Ekstrakcija primjenom pulsirajućeg električnog polja

Metoda ekstrakcije bazira se na primjeni električnog polja napona između 12 i 80 kV/cm u kratkim pulsevima (1 - 100 μ s) na biljni materijal smješten u komori između dvije elektrode. Proces se odvija pri sobnoj temperaturi u vremenu trajanja manje od 1 s (Lelas, 2006). Mehanizam djelovanja električnog polja očituje se u povećanju permeabilnosti stanične membrane te u konačnici razaranju strukture biljne stanice. Prolaskom električnog pulsa odgovarajućeg napona kroz staničnu membranu inducira se razdvajanje molekula s obzirom na njihov dipolni karakter. Na taj način dolazi do formiranja pora u membrani, tj. slabljenja stanične strukture i oslobađanja unutarstaničnog sadržaja. Prema Boussetta i *sur.* (2015) primjena pulsirajućeg električnog polja ubrzava i pospješuje proces ekstrakcije bioaktivnih komponenata koji ovisi o nizu parametara kao što su napon električnog polja, broj pulseva i njihovo trajanje, električna vodljivost, temperatura i pH tijekom odvijanja procesa.

2.4.7. Enzimska razgradnja

Enzimska razgradnja je predtretman koji se koristi za razgradnju staničnih membrana primjenom enzima. S obzirom na vrstu stanice postoje različiti enzimi koji se mogu primijeniti za proces razgradnje kao što su celulaza, α –amilaza i pektinaza koje ubrzavaju proces razgradnje stanične stijenke i hidrolizu strukturnih polisaharida i lipida. Međutim, faktori koji mogu imati veliki utjecaj na provođenje ekstrakcije su enzimska struktura i koncentracija,

veličina čestica usitnjenog biljnog materijala, omjer materijala i otapala te vrijeme hidrolize (Azmir i *sur.*, 2013). Uz navedene faktore potrebno je uzeti u obzir temperaturu i pH koji mogu imati značajan utjecaj na stabilnost enzima.

2.5. UV/Vis spektrofotometrija

Spektrofotometrija je grana analitičke kemije koja proučava utjecaj elektromagnetskog zračenja na strukturu tvari i njihov kemijski sastav te spektre dobivene apsorpcijom svjetlosti određene valne duljine. U skladu s navedenim, UV/Vis spektrofotometrija uključuje proučavanje djelovanja ultraljubičastog (200 - 400 nm) i vidljivog (400 - 800 nm) dijela spektra pri identifikaciji i određivanju različitih organskih i anorganskih kemijskih vrsta. Određivanje kemijskih vrsta koje nisu u mogućnosti apsorbirati UV/Vis zračenje vrši se preko njihovih derivata koji se dobivaju u reakcijama s određenim kromogenim reagensima. Odnos apsorbanције i koncentracije analizirane vrste povezuje Lambert - Beerov zakon:

$$A = \varepsilon b c$$

gdje je A apsorbanција analita, ε molarni apsorpcijski koeficijent, b debljina sloja otopine te c množinska koncentracija analita.

Koncentracija analita je direktno proporcionalna apsorbanциji, što olakšava vrlo jednostavno računanje nepoznate koncentracije analita u uzorcima na temelju izmjerene vrijednosti apsorbanције.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijal

Listovi ružmarina sakupljeni u području Srednje Dalmacije (Trogir, Hrvatska) te osušeni i usitnjeni.



Slika 4. Usitnjeni listovi ružmarina.

3.2. Kemikalije

- Etanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Aluminijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Acros Organics, New Jersey, USA)
- Metanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat, bezvodni (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev nitrit (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)
- Natrijev hidroksid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Rutin (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)

3.3. Aparatura i pribor

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Automatska pipeta voluena 40 - 200 μ L (KemoLab, Zagreb, Hrvatska)

- Infracrveni termometar, B220 (Trotec, Njemačka)
- Kolorimetar CM - 3500d (Konica Minolta Sensing, Inc. Osaka, Japan)
- Magnetska miješalica (IKA, RH basic 2, Boutersem, Belgija)
- Ultrazvuk (dr. Hielcher, GmbH, Teltow, Njemačka)
- Ultrazvučna sonda promjera 22 mm (dr. Hielcher, GmbH, Teltow, Njemačka)
- UV/ Vis Spektrofotometar (PERKIN-ELMER, Lambda 1, Massachusetts, USA)
- Boce za čuvanje otopina od 500 mL
- Falcon kivete za čuvanje uzoraka, 50 ml
- Graduirane pipete od 1, 2 i 5 mL
- Menzure od 10, 100 i 500 mL
- Odmjerne tikvice od 25, 50, 100 i 500 mL
- Povratno hladilo
- Propipeta
- Staklene čaše od 50 i 100 mL
- Staklene kapaljke
- Stakleni lijevci
- Tikvica s okruglim dnom od 250 mL
- Uljna kupelj

3.4. Metode rada

Metode za ekstrakciju i određivanje ukupnih fenola i flavonoida primjenjene u ovom radu su sljedeće: ekstrakcija ultrazvukom visokog intenziteta i refluksiranjem te određivanje udjela polifenola u uzorku spektrofotometrijskim testom u ultraljubičastom (UV) i vidljivom području (Vis) elektromagnetskog zračenja. Također, provedeno je određivanje boje na kolorimetru.

3.4.1. Ekstrakcija polifenola iz ružmarina ultrazvukom visokog intenziteta

Princip ekstrakcije ultrazvukom visokog intenziteta opisan je u poglavlju 2.4.5. Postupak rada je sljedeći: 3,000 g osušenog i usitnjenog ružmarina suspendira se u 100 mL 30 ili 70 % (v/v) etanola. Potom se provodi ekstrakcija ultrazvučnom sondom promjera 22 mm u vremenskim intervalima od 3, 6 i 9 min. Preostali procesni parametri primijenjeni u ekstrakciji ultrazvukom su: izlazna snaga 400 W, frekvencija 30 kHz, ciklus 1, amplituda 60, 80 i 100 %.

Također, svakom uzorku izmjerena je temperatura prije i nakon ekstrakcije ultrazvukom pomoću infracrvenog termometra.

Uzorci dobiveni ekstrakcijom podvrgnuti su ručnom tiještenju kroz gazu, a potom su procijeđeni kroz cjedilo. Dobivena otopina se profiltrira kroz obični filter papir u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se do oznake nadopuni s otapalom korištenim za ekstrakciju (30 i 70 %, v/v etanol). Ekstrahirani uzorak se do daljnje analitičke obrade čuva u hladnjaku na +4°C.

3.4.2. Ekstrakcija polifenola iz ružmarina refluksiranjem

Princip ekstrakcije refluksiranjem opisan je u poglavlju 2.4.3. Postupak pripreme uzorka za ekstrakciju refluksiranjem je isti kao i kod ekstrakcije ultrazvukom visokog intenziteta, dakle, 3,000 g osušenog i usitnjenog uzorka suspendira se u 100 mL 30 i 70 % (v/v) etanola. Procesni parametri ključni za provedbu ekstrakcije su vrijeme od 1,5 i 3 h. Daljnji postupak obrade ekstrakata filtriranjem je identičan onom opisanom kod ekstrakcije ružmarina ultrazvukom.

3.4.3. Određivanje boje u etanolnim ekstraktima ružmarina

Uzorcima dobivenim metodama ekstrakcije ultrazvukom i refluksiranjem (30 i 70 % -tni etanolni ekstrakti ružmarina) određena je boja na kolorimetru CM - 3500d koji se zasniva na suvremenom sustavu razrađenom po uputama CIELab-a (Commission Internationale de L'Eclairage - Međunarodna komisija za regulaciju svjetla). Princip određivanja boje zasniva se na mjerenju tona, zasićenosti i svjetlini boje, tj. na kvantitativnom određivanju vrijednosti svjetline (L), udjela crvene (a) i udjela žute boje (b).

3.4.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida

3.4.4.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola

- Priprema 0,2 M otopine Folin - Ciocalteu (FC) reagensa: 2,5 mL 2 M otopine FC reagensa otpipetira se u odmjernu tikvicu od 25 mL i do oznake nadopuni destiliranom vodom.
- Priprema 20 % (*w/v*) otopine natrijeva karbonata (Na_2CO_3): 200 g Na_2CO_3 otopi se u 800 mL vruće, ključale destilirane vode te ostavi hladiti. Nakon hlađenja otopina se prebaci u odmjernu tikvicu od 1000 mL te se dodaje nekoliko kristalića Na_2CO_3 . Cjelokupni sadržaj se nakon 24 h profiltrira kroz običan filter papir.

3.4.4.2. Postupak određivanja ukupnih fenola

Za određivanje nepoznatih masenih udjela ukupnih fenola u uzorcima (30 i 70 % - tni etanolni ekstrakt ružmarina) dobivenih ekstrakcijom ultrazvukom i refluksiranjem potrebno je napraviti baždarni dijagram upotrebom galne kiseline kao standarda.

Priprema se sastoji od vaganja 0,5 g galne kiseline te otapanja u 10 mL etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL, nakon čega se sadržaj u tikvici nadopuni destiliranom vodom do oznake. Ovako priređena polazna otopina galne kiseline služi za pripremu pojedinačnih standardnih otopina točno određenih masenih koncentracija od 10, 30, 50, 100, 130 i 180 mg/L. Pojedinačne otopine se pripremaju pipetiranjem alikvota od 0,2; 0,6; 1,0; 2,0; 2,6 i 3,6 mL ishodne otopine u odmjernu tikvicu od 100 mL, koje se potom nadopune destiliranom vodom do oznake.

Ove otopine se koriste za mjerenje apsorbancije pipetiranjem 1 mL pojedinačnog standarda, 10 mL destilirane vode i 1,25 mL 0,2 M FC reagensa u odmjernu tikvicu od 25 mL. Nakon stajanja od 5 min u tikvicu se dodaje 3,75 mL 20 % - tne otopine Na_2CO_3 te se sadržaj u tikvici nadopuni destiliranom vodom do oznake. Za slijepu probu je upotrebljen 1 mL destilirane vode. Priređene otopine u odmjernim tikvicama čuvaju se 2 h na sobnoj temperaturi, na tamnom mjestu, nakon čega im se mjeri apsorbancija pri 760 nm. Na temelju dobivenih podataka izradi se baždarni dijagram ovisnosti masene koncentracije o apsorbanciji na temelju kojeg se određuju nepoznate koncentracije ukupnih fenola u ekstrahiranim uzorcima ružmarina.

Za analizu uzoraka (etanolni ekstrakti ružmarina) otopine su pripremljene na isti način kao i za mjerenje apsorbancije standardnih otopina, ali umjesto 1 mL standarda otpipetirano je 0,05 mL uzorka. Za slijepu probu upotrijebljena je destilirana voda (1 ili 0,05 mL).

3.4.3.3. Priprema otopina za određivanje flavonoida

- Priprema 5 %-tne (*w/v*) otopine natrijeva nitrita (NaNO_2): 5 g NaNO_2 otopi se u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- Priprema 10 %-tne (*w/v*) otopine aluminijskoga klorida (AlCl_3): 10 g AlCl_3 otopi se u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- Priprema 1 M otopine natrijeva hidroksida (NaOH): 2 g NaOH otopi se u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 50 mL.

3.4.3.4. Postupak određivanja flavonoida

Kao i kod određivanja ukupnih fenola, i kod flavonoida je potrebno napraviti baždarni dijagram na temelju kojeg će se odrediti maseni udjeli flavonoida u 30 i 70 %-tnim etanolnim ekstraktima ružmarina.

Za određivanje flavonoida potrebno je pripremiti standardnu otopinu rutina. Točno 0,1000 g rutina otopi se u 10 mL metanola u odmjerenoj tikvici od 100 mL, a zatim se tikvica nadopuni s destiliranom vodom do oznake. Tako priređena ishodna otopina rutina služi za pripremu pojedinačnih standardnih otopina masene koncentracije 5, 20, 40, 60, 80 i 120 mg/L. Standardi se pripremaju u odmjerenoj tikvici od 100 mL pipetiranjem 0,5; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 i 12,0 mL alikvota ishodne otopine, a potom se tikvice nadopune destiliranom vodom do oznake.

Za mjerenje apsorbancije otpipetira se 1 mL alikvota pojedinačno pripremljenih standarda, zatim se doda 2 mL destilirane vode i 0,3 mL 5 %-tne otopine NaNO_2 . Sadržaj se ostavi stajati 5 min, a zatim se doda 0,5 mL 10 %-tne otopine AlCl_3 . Nakon sljedećih 6 min dodano je 2 mL 1 M otopine NaOH , pri čemu dolazi do stvaranja aluminij - flavonoidnih kompleksa s C-4 keto i C-3 ili C-5 hidroksidnim skupinama flavona i flavanola koje daju narančasto obojenje. Apsorbancija je izmjerena pri valnoj duljini od 510 nm. Na temelju dobivenih podataka izradi se baždarni dijagram koji će služiti za određivanje masenih udjela ukupnih flavonoida u etanolnim ekstraktima ružmarina.

Određivanja flavonoida u etanolnim ekstraktima ružmarina sastoji se od istih postupaka kao i kod pripreme standarada, ali umjesto 1 mL standarda otpipetirano je 0,1 mL otopine uzorka u odmjernim tikvicama od 25 mL, koje su nadopunjene destiliranom vodom do oznake. Za slijepu probu upotrijebljena je destilirana voda (1 i 0,1 mL).

4. Rezultati i rasprava

U ovom radu određeni su maseni udjeli ukupnih fenola i flavonoida u 30 i 70 %-tnim etanolnim ekstraktima ružmarina dobivenih primjenom ultrazvuka visokog intenziteta i refluksiranja. Određivanje masenih udjela ukupnih fenola i flavonoida provedeno je analitičkom, UV/Vis spektrofotometrijskom metodom, koja se temelji na:

- kolornoj reakciji fenolnih spojeva sa smjesom fosfomolibdenske i fosfomolibdenske kiseline tj. s Folin-Ciocalteu reagensom (ukupni fenoli)
- formiranju stabilnog aluminijsko-flavonoid kompleksa između aluminijske i C4 keto skupine i C3 ili C5 hidroksilne skupine flavona i flavonola (ukupni flavonoidi)

Ključni procesni parametri u ekstrakciji ružmarina ultrazvukom bili su vrijeme ekstrakcije od 3, 6 i 9 min te jačina amplitude od 60, 80 i 100 %, dok je kod tehnike refluksiranja vrijeme ekstrakcije od 1,5 i 3 h. Ekstrahiranim uzorcima određena je boja. U nastavku se nalaze rezultati i zaključci provedenog istraživanja.

4.1. Određivanje boje u etanolnim ekstraktima ružmarina

Određivanje boje provedeno je na 30 i 70 %-tnim etanolnim ekstraktima ružmarina dobivenih ekstrakcijom ultrazvukom visokog intenziteta (Tablica 1) i refluksiranjem (Tablica 2). Na temelju dobivenih vrijednosti svjetline (L), udjela crvene boje (a) i udjela žute boje (b) određena je ukupna razlika obojenosti (ΔE) prema sljedećoj formuli:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

Kako bi se mogla pratiti promjena ili razlika boje etanolnih ekstrakata ružmarina, pripremljeni su i vodeni ekstrakti metodom refluksiranja, a predstavljaju ih referentni uzorci R1 i R3 (Tablica 2).

Tablica 1. Parametri boje određeni u 30 i 70 %-tnim etanolnim ekstraktima ružmarina dobivenih ekstrakcijom ultrazvukom visokog intenziteta.

Uzorak	t (ekstrakcije)/min	Amplituda/%	L^*	a^*	b^*	ΔE
30 % (v/v) etanol						
1-LM	3	100	74,31	12,22	58,01	8,53
2-LM	6		80,36	6,86	52,69	5,23
3-LM	9		86,85	1,53	45,05	15,11
4-LM	3	80	80,56	7,88	49,81	8,18
5-LM	6		81,22	6,23	50,93	6,99
6-LM	9		84,71	3,25	46,20	12,80
7-LM	3	60	81,27	7,44	48,74	9,21
8-LM	6		81,18	7,27	50,09	7,84
9-LM	9		85,77	2,99	42,69	16,42
70 % (v/v) etanol						
10-LM	3	100	90,19	-10,35	50,13	20,94
11-LM	6		89,59	-8,42	57,79	17,47
12-LM	9		89,70	-4,93	54,31	15,06
13-LM	3	80	89,16	-11,23	54,53	20,05
14-LM	6		89,09	-9,64	58,25	18,30
15-LM	9		88,96	-7,49	58,89	16,38
16-LM	3	60	91,26	-10,47	45,26	23,73
17-LM	6		88,42	-10,94	58,62	19,21
18-LM	9		87,76	-9,99	62,50	18,64

Primjenom ultrazvuka visokog intenziteta te određivanjem boje ekstrakata dobivaju se L , a i b vrijednosti (Tablica 1) na temelju kojih se može zaključiti da su uzorci ekstrahirani s 70 %-tnim etanolom svjetliji u odnosu na one ekstrahirane s 30 %-tnim etanolom. Pripadajuće L vrijednosti 70 %-tnih uzoraka kreću se u intervalu od 87,76 do 90,19, a kod 30 %-tnih uzoraka od 74,31 do 86,85. Također, udio crvene boje (a) kod 70 %-tnih uzoraka je manji (-11,23 do -4,93) u odnosu na 30 %-tne uzorke (1,53 do 12,22), dok se udio žute boje (b) kod 30 i 70 %-tnih uzoraka kreće u sličnim intervalima. Najveća razlika obojenosti kod uzoraka tretiranih ultrazvukom uočava se kod 16-LM ekstrakta (3 min, 100 %-tna amplituda, 70 %-tni etanol), u odnosu na R1 i R3 referente uzorke (Tablica 2). Najmanja razlika obojenosti dobiva se kod 2-LM uzorka, tretiranog 6 min na 60 % amplitudi u 30 %-tnom etanolu.

Tablica 2. Parametri boje određeni u 30 i 70 %-tnim etanolnim ekstraktima ružmarina dobivenih ekstrakcijom refluksiranjem.

Uzorak	t (ekstrakcije)/min	L^*	a^*	b^*	ΔE
30 % (v/v) etanol					
R9	3	74,1	11,03	60,77	8,49
R11	1,5	84,15	5	50,85	7,99
70 % (v/v) etanol					
R5	3	87,15	-0,51	50,02	12,41
R8	1,5	80,65	5,98	60,82	3,00
Destilirana voda					
R1	3	80,79	6,67	57,9	0
R3	1,5	87,19	0,69	43,64	16,74

R1 i R3 = referentni uzorci

Kod ekstrakcije refluksiranjem (Tablica 2) može se uočiti da je uzorak R5 tretiran 3 h sa 70 %-tnim etanolom najsvjetliji ($L = 87,15$), a uzorak R9 tretiran pri istom vremenu s 30 %-tnim etanolom najtamniji ($L = 74,1$).

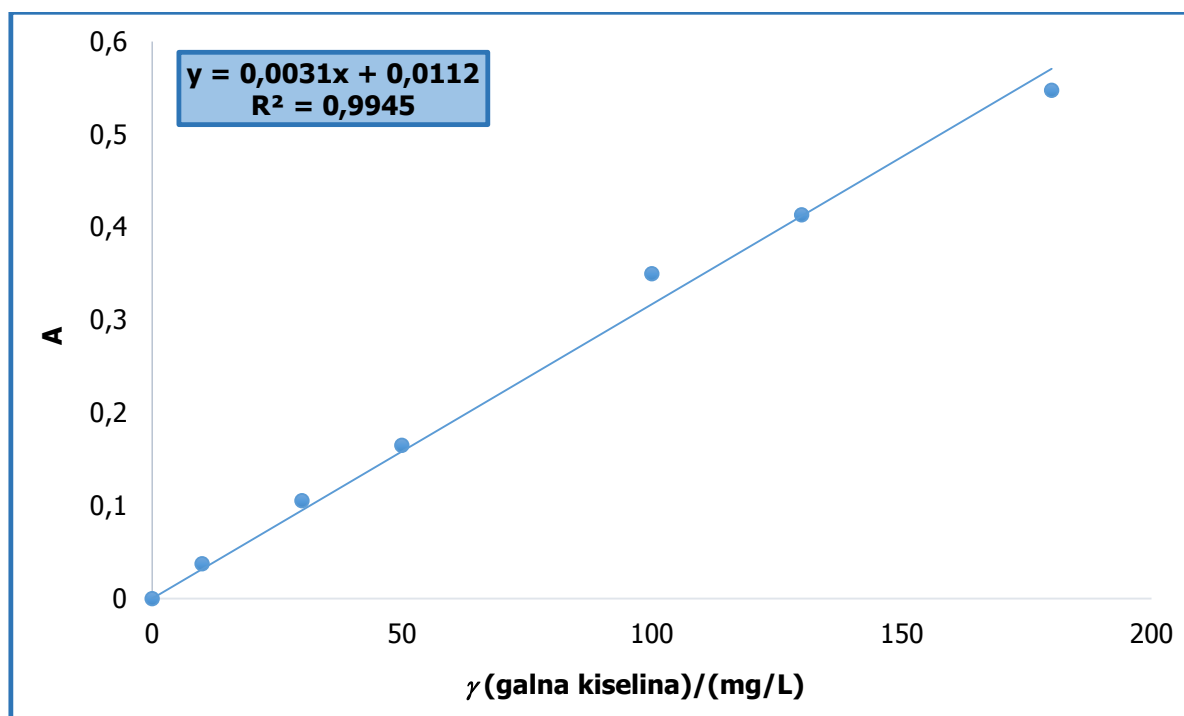
Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da odabir metode ekstrakcije, parametara ekstrakcije i otapala značajno utječe na obojenost ekstrakata. Dakle, navedeni uvjeti mogu se podesiti ovisno o željenoj boji ekstrakta i njegovoj krajnjoj upotrebi.

4.2. Određivanje ukupnih fenola u etanolnim ekstraktima ružmarina

Nepoznate koncentracije ukupnih fenola u pripravljenim 30 i 70 %-tnim etanolnim ekstraktima ružmarina, dobivenih ekstrakcijom ultrazvukom visokog intenziteta i refluksiranjem, određene su na temelju poznatih masenih koncentracija pripravljenih individualnih standardnih otopina galne kiseline i njihovih pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih pri valnoj duljini od 760 nm (Tablica 3, Slika 5). Iz izmjerene vrijednosti apsorbancija pripravljenih 30 i 70 %-tnih etanolnih ekstrakata određena je masena koncentracija ukupnih fenola iz regresijskog pravca (baždarni dijagram, Slika 5), a potom su rezultati izraženi kao mg galne kiseline na g ekstrahiranog lišća ružmarina (maseni udio, w).

Tablica 3. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina galne kiseline te pripadajuće vrijednosti apsorbancije izmjerene pri valnoj duljini od 760 nm.

Standardna otopina	γ (galna kiselina)/(mg/L)	Apsorbancija
0	0	0,000
1	10	0,038
2	30	0,106
3	50	0,165
4	100	0,350
5	130	0,414
6	180	0,548



Slika 5. Baždarni dijagram ovisnosti masene koncentracije galne kiseline o vrijednosti apsorbancije.

U Tablici 4 prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u 30 i 70 %-tnim ekstraktima ružmarina dobivenih ekstrakcijom ultrazvukom visokog intenziteta.

Tablica 4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u 30 i 70 %-tnim etanolnim ekstraktima ružmarina dobivenih primjenom ultrazvuka visokog intenziteta.

Uzorak	<i>t</i> (ekstrakcije)/min	Amplituda/%	A ± SD	<i>w</i> (mg/g) ± SD
30 % (<i>v/v</i>) etanol				
1-LM	3	100	0,153±0,002	762,4±10,7
2-LM	6		0,206±0,000	1047,3±0,0
3-LM	9		0,234±0,000	1197,9±0,0
4-LM	3	80	0,137±0,000	676,3±0,0
5-LM	6		0,188±0,001	947,9±2,7
6-LM	9		0,225±0,000	1149,5±0,0
7-LM	3	60	0,120±0,005	586,3±28,5
8-LM	6		0,144±0,012	712,6±66,1
9-LM	9		0,189±0,008	955,9±40,4
70 % (<i>v/v</i>) etanol				
10-LM	3	100	0,177±0,006	891,4±24,3
11-LM	6		0,236±0,003	1208,6±16,6
12-LM	9		0,265±0,006	1364,5±29,7
13-LM	3	80	0,146±0,001	724,7±3,8
14-LM	6		0,200±0,000	1016,4±2,3
15-LM	9		0,224±0,001	1141,4±2,7
16-LM	3	60	0,121±0,004	589,0±20,6
17-LM	6		0,153±0,003	763,7±14,9
18-LM	9		0,180±0,004	908,9±22,9

N = 4

Na temelju rezultata prikazanih u Tablici 4 može se zaključiti da vrijeme ekstrakcije (3, 6 i 9 min) kao i veličina amplitude (60, 80 i 100 %) značajno utječu na maseni udio ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima. I kod 30 i 70 %-tnih etanolnih ekstrakata može se uočiti da povećanje vremena ekstrakcije (od 3 na 9 min) utječe i na povećanje prinosa polifenola pa se najveći maseni udio dobiva ekstrakcijom od 9 min, a najmanji pri 3 min.

Osim vremena ekstrakcije i vrijednost primjenjene amplitude utječe na prinos ukupnih fenola. Tako primjerice 100 % amplituda daje najveći maseni udio ukupnih fenola u odnosu na preostale dvije (60 i 80 %). Kod 30 %-tnih ekstrakata najveći maseni udio (1197,9 mg/g) se postiže kod uzorka 3-LM čija se ekstrakcija odvijala 9 min pri amplitudi od 100 %. Najmanja vrijednost masenog udjela (586,3 mg/g) se dobiva kod uzorka 7-LM ekstrahiranog 3 min pri amplitudi od 60 %.

Uzorci dobiveni ekstrakcijom u 70 %-tnom etanolu pokazuju isti utjecaj vremena ekstrakcije i amplitude na prinos ukupnih fenola kao i 30 %-tni uzorci. Tako ekstrakt 12-LM pokazuje najveću (1364,5 mg/g) a 16-LM najmanju (589,0 mg/g) vrijednost masenog udjela.

Ako ove rezultate usporedimo s vrijednostima izmjerenih temperatura prije i nakon ekstrakcije (Tablica 5), vidimo da je promjena temperature (ΔT) u korelaciji s masenim udjelima ukupnih fenola. Drugim riječima, veća temperatura utječe na bolju ekstrakciju polifenola i obrnuto, niža temperatura dovodi do njihove slabije ekstrakcije. Dakle, možemo zaključiti da i temperatura, osim vremena i amplitude, predstavlja jedan od važnih parametara u ultrazvučnoj ekstrakciji.

Usporedbom otapala korištenih pri ekstrakciji lišća ružmarina, može se zaključiti da 70 %-tni etanol daje nešto veći prinos ukupnih fenola (1364,5 mg/g, 9 min pri 100 %-tnoj amplitudi) u odnosu na 30 %-tni etanol (1197,9 mg/g, 9 min pri 100 %-tnoj amplitudi).

Tablica 5. Izmjerene vrijednosti temperatura prije (T_o) i nakon (T_k) ultrazvučne ekstrakcije 30 i 70 %-tnih etanolnih uzoraka ružmarina.

Uzorci	t (ekstrakcije)/min	Amplituda/%	$T_0/^{\circ}\text{C}$	$T_K/^{\circ}\text{C}$	ΔT
30 % (v/v) etanol					
1-LM	3	100	21,5	34,4	12,9
2-LM	6		21,9	46,0	24,1
3-LM	9		22,0	56,3	34,3
4-LM	3	80	21,6	32,3	10,7
5-LM	6		21,8	36,0	14,2
6-LM	9		21,2	42,9	21,7
7-LM	3	60	21,7	28,5	6,80
8-LM	6		21,4	30,3	8,90
9-LM	9		21,4	32,9	11,5
70 % (v/v) etanol					
10-LM	3	100	21,6	39,8	18,2
11-LM	6		21,8	53,0	31,2
12-LM	9		22,1	60,7	38,6
13-LM	3	80	21,8	34,4	12,6
14-LM	6		21,7	46,1	24,4
15-LM	9		22,0	52,1	30,1
16-LM	3	60	21,4	27,9	6,50
17-LM	6		20,9	38,3	17,4
18-LM	9		20,8	42,7	21,9

Rezultati određivanja ukupnih fenola u 30 i 70 %-tnim etanolnim ekstraktima ružmarina dobivenih procesom refluksiranja prikazani su u Tablici 6. Na temelju prikazanih podataka može se zaključiti da povećanjem vremena ekstrakcije dolazi i do porasta masenih udjela ukupnih fenola u ispitivanim uzorcima. Usporedbom dvaju otapala primijenjenih pri ekstrakciji ružmarina može se uočiti da 70 %-tni etanol djeluje kao efikasnije ekstrakcijsko sredstvo u odnosu na 30 %-tni etanol.

Tablica 6. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u 30 i 70 %-tnim etanolnim ekstraktima ružmarina dobivenih primjenom metode refluksiranja.

Uzorak	t (ekstrakcije)/(h)	$A \pm SD$	w (mg/g) $\pm SD$
30 % (v/v) etanol			
R9	3	0,296 \pm 0,001	1529,8 \pm 4,5
R12	1,5	0,243 \pm 0,002	1243,6 \pm 8,1
70 % (v/v) etanol			
R6	3	0,304 \pm 0,006	1572,9 \pm 29,3
R7	1,5	0,282 \pm 0,004	1453,2 \pm 19,2

Važno je naglasiti da gotovo i ne postoje znanstveni radovi koji proučavaju ekstrakciju polifenola iz ružmarina pa i usporedba ovih dobivenih rezultata s drugim vrijednostima nije bila moguća. Valja istaknuti rad Rodriguez - Rojo i *sur.* (2012) koji dobivaju široki raspon vrijednosti ukupnih fenola, ružmarinske i karnosolne kiseline, ovisno o otapalu (etanol i voda), metodi ekstrakcije (ekstrakcija u vodenoj kupelji, ekstrakcija mikrovalovima i ekstrakcija ultrazvukom) i postupcima predtretiranja uzorka.

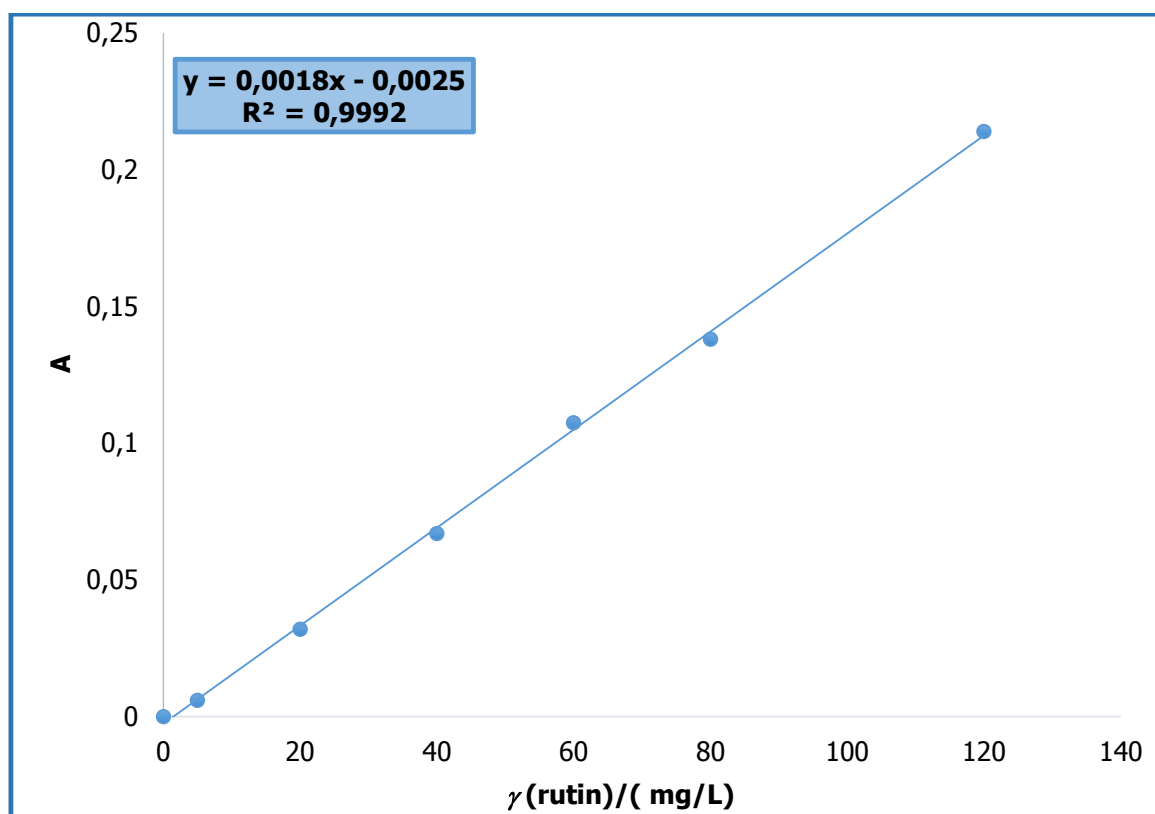
4.3. Određivanje flavonoida u etanolnim ekstraktima ružmarina

U 30 i 70 %-tnim ekstraktima ružmarina dobivenih ekstrakcijom ultrazvukom i refluksiranjem određen je maseni udio flavonoida na temelju baždarnog dijagrama rutina koji prikazuje ovisnost vrijednosti apsorbancije o masenoj koncentraciji pojedinačnih standardnih otopina rutina (Tablica 7). Iz regresijskog pravca (Slika 6) određene su masene koncentracije

ukupnih flavonoida u etanolnim ekstraktima, a dobivene vrijednosti su izražene kao mg rutina na g osušenog lišća ružmarina (maseni udio, w).

Tablica 7. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina rutina te pripadajuće vrijednosti apsorbancije izmjerene pri valnoj duljini od 510 nm.

Standardna otopina	$\gamma(\text{rutin})/(\text{mg/L})$	Apsorbancija
0	0	0
1	5	0,006
2	20	0,032
3	40	0,067
4	60	0,108
5	80	0,138
6	120	0,214



Slika 6. Baždarni dijagram ovisnosti masene koncentracije rutina o vrijednosti apsorbancije.

U Tablici 8 prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u 30 i 70 %-tnim ekstraktima ružmarina dobivenih ekstrakcijom ultrazvukom visokog intenziteta.

Tablica 8. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u 30 i 70 %-tnim etanolnim ekstraktima ružmarina dobivenih primjenom ultrazvuka visokog intenziteta.

Uzorak	<i>t</i> (ekstrakcije)/min	Amplituda/%	A ± SD	<i>w</i> (mg/g) ± D
30 % (<i>v/v</i>) etanol				
1-LM	3	100	0,080±0,002	381,9±9,3
2-LM	6		0,134±0,000	631,9±0,0
3-LM	9		0,159±0,000	747,7±0,0
4-LM	3	80	0,064±0,001	307,9±5,7
5-LM	6		0,103±0,000	488,4±0,0
6-LM	9		0,138±0,000	650,5±0,0
7-LM	3	60	0,049±0,000	238,4±0,0
8-LM	6		0,070±0,001	333,3±2,3
9-LM	9		0,106±0,001	500,0±2,3
70 % (<i>v/v</i>) etanol				
10-LM	3	100	0,088±0,002	420,1±11,5
11-LM	6		0,122±0,000	576,4±0,0
12-LM	9		0,142±0,000	669,0±0,0
13-LM	3	80	0,071±0,000	340,3±0,0
14-LM	6		0,093±0,013	442,1±57,9
15-LM	9		0,117±0,001	550,9±2,3
16-LM	3	60	0,057±0,001	273,2±2,3
17-LM	6		0,082±0,001	391,2±6,0
18-LM	9		0,103±0,000	488,4±0,0

Dobiveni rezultati pokazuju da se maseni udio ekstrahiranih flavonoida mijenja s vremenom ekstrakcije i primjenjenom amplitudom kao i kod ukupnih fenola. Najveće vrijednosti se dobivaju pri vremenu ekstrakcije od 9 min te amplitudi od 100 %, a najmanje pri vremenu ekstrakcije od 3 min te amplitudi od 60 %. Međutim, usporedbom otapala korištenih pri ekstrakciji ružmarina pokazalo se da kod nekih vrsta uzoraka 30 %-tni etanol daje veće vrijednosti masenog udjela ukupnih flavonoida pri istim uvjetima ekstrakcije u odnosu na 70 %-tni etanol. Kao primjer navedenog mogu poslužiti uzorci 3-LM (747,7 mg/g) i 12-LM

(669,0 mg/g) ekstrahirani 9 min, pri 100 %-tnoj amplitudi. Slično se ponašaju i uzorci ekstrahirani pri 80 i 60 % amplitudi, kod vremena ekstrakcije od 9 min.

Na temelju rezultata dobivenih refluksiranjem listova ružmarina u 30 i 70 %-tnom etanolu (Tablica 9) može se zaključiti da je proces ekstrakcije bio uspješniji primjenom 30 %-tnog etanola (893,5 mg/g), u odnosu na 70 %-tni etanol (785,9 mg/g) pri vremenu ekstrakcije od 3 h. Naime, povećano vrijeme ekstrakcije u kombinaciji sa 70 %-tnim etanolom dovodi do slabije ekstrakcije polifenola iz biljnog materijala.

Tablica 9. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u 30 i 70 %-tnim etanolnm ekstraktima ružmarina dobivenih primjenom metode refluksiranja.

Uzorak	t (ekstrakcije)/h	$A \pm SD$	w (mg/g) $\pm SD$
30 % (v/v) etanol			
R9	3	0,191 \pm 0,005	893,5 \pm 20,8
R12	1,5	0,165 \pm 0,000	775,5 \pm 0,0
70 % (v/v) etanol			
R6	3	0,167 \pm 0,001	785,9 \pm 6,0
R7	1,5	0,173 \pm 0,001	810,2 \pm 2,3

5. Zaključak

Na temelju podataka dobivenih određivanjem polifenola u listovima ružmarina metodama ekstrakcije ultrazvukom i refluksiranjem, može se zaključiti da je ekstrakcija refluksiranjem bolja za izolaciju ovih biljnih komponenata u odnosu na ekstrakciju ultrazvukom visokog intenziteta. Naime metodom refluksiranja dobivaju se veće vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola i flavonoida.

Nadalje, pokazalo se da i odabir otapala za ekstrakciju ima značajan utjecaj na konačan prinos polifenola. Tako pri izolaciji ukupnih fenola, 70 %-tni etanol se pokazao boljim otapalom jer daje veće vrijednosti masenih udjela u odnosu na 30 %-tni etanol. Suprotno, kod ekstrakcije flavonoida, 30 %-tni etanol se pokazao efikasnijim otapalom u odnosu na 70 % etanol.

Osim utjecaja metode ekstrakcije i otapala na prinos polifenola, provedeno istraživanje je pokazalo kako i procesni parametri, poput vremena ekstrakcije i amplitude utječu na prinos ukupnih fenola i flavonoida. Stoga, vrijeme od 9 min i 100 % amplituda doprinose njihovoj najučinkovitijoj ekstrakciji.

Zaključno, unatoč tome što se ekstrakcija refluksiranjem pokazala boljom metodom za izolaciju polifenola iz listova ružmarina, u daljnjem ispitivanju antikorozijskog djelovanja će se primijeniti ekstrakcija ultrazvukom visokog intenziteta jer je u kratkom vremenu od 9 min i 100 % amplitudi moguće pripremiti veći broj ekstrakata, a dobivene vrijednosti su neznatno manje u odnosu na one kod metode refluksiranja.

6. Popis literature

- Ali B., Al - Wabel N. A., Shams S., Ahamad A., Alam Khan S., Anwar F. (2015) Essential oils use in aromatherapy: A systematic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **5**: 601 - 611.
- Al - Otaibi M. S., Al - Mayouf A. M., Khan M., Mousa A. A., Al - Mazroa S. A., Alkhathlan H. Z. (2012) Corrosion inhibitory action of some plant extracts on the corrosion of mild steel in acidic media. *Arabian Journal of Chemistry* **7**: 340 - 346.
- Amarowicz R, Pegg R. B., Raim-Mohaddam P, Bral B, Weil J. A. (2004) Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian Prairies. *Food Chemistry* **84**: 551 - 562.
- Atanassova M., Georgieva S., Ivancheva K. (2011) Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* **46**: 81 - 88.
- Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N., Omar A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. *Journal of Food Engineering* **117**: 426 - 436.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006) Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**: 191 - 203.
- Berend S., Grabarić Z. (2008) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **59**: 205 - 212.
- Boussetta N., Grimi N., Vorobiev E. (2015) Pulsed Electrical Technologies Assisted Polyphenols Extraction from Agricultural Plants and Bioresources: A Review. *International Journal of Food Processing Technology* **2**: 1 - 10.
- Brglez Mojzer E., Knez Hrn M., Škerget M., Knez Ž., Bren U. (2016) Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **21**: 1 - 38.
- Dinnies Santos R., Shetty K., Lourenço Cecchini A., da Silva Miglioranza L. H. (2012) Phenolic compounds and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extracts and its use in cheese spread. *Artigos /Articles* **33**: 655 - 666.

Drużynska B., Stepniewska A., Wołosiak R. (2007) The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* **6**: 27 - 36.

Galvan d'Alessandro L., Kriaa K., Nikov I., Dimitrov K. (2012) Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology* **93**: 42 - 47.

Herrero M, Plazab M., Cifuentesb A., Ibanez E. (2010) Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *Journal of Chromatography A* **1217**: 2512 - 2520.

Khoddami A., Wilkes M. A., Roberts T. H. (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **18**: 2328 - 2375.

Lelas V. (2006) Nove tehnike procesiranja hrane. *Mljekarstvo* **56**: 311 - 330.

Mulinacci M., Innocenti M., Bellumori M., Giaccherini C., Martini V., Michelozzi M. (2011) Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: An HPLC/DAD/MS study. *Talanta* **85**: 167 - 176.

Rodríguez-Rojó S., Visentin A, Maestri D., Cocero M. J. (2012) Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering* **109**: 98 - 103.

Sun Y., Liu Z., Wang J. (2011) Ultrasound-assisted extraction of five isoflavones from *Iris tectorum* Maxim. *Separation and Purification Technology* **78**: 49 - 54.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni

Leonina Moslavac

ime i prezime studenta